PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 00/34433**
C12M 1/34, 1/12	A1	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 15. Juni 2000 (15.06.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/09422

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Dezember 1999 (02.12.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 56 136.9 4. Dezember 1998 (04.12.98) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 25, rue du Dr. Roux, F–75724 Paris Cedex 15 (FR).

(71)(72) Anmelder und Erfinder: MUTZEL, Rupert [DE/DE]; An der Steig 19, D–78464 Konstanz (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: MARLIERE, Philippe [FR/FR]; 2, Allée Saint Martin, F–91450 Etiolles (FR).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D–81675 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AT (Gebrauchsmuster), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE (Gebrauchsmuster), DK, DK (Gebrauchsmuster), EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

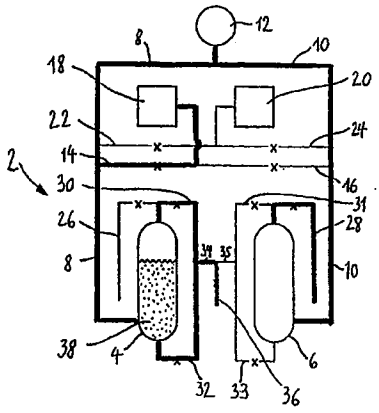
Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR SELECTING ACCELERATED PROLIFERATION OF LIVING CELLS IN SUSPENSION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR SELEKTION BESCHLEUNIGTER PROLIFERATION LEBENDER ZELLEN IN SUSPENSION

(57) Abstract

The invention relates to a method and a device for selecting accelerated proliferation of living cells in suspension. The inventive culture apparatus (2) enables cells to proliferate in suspension over unlimited periods. Natural selection results in the accumulation of genetic variants which are increasingly better adapted to the chosen culture conditions. The organisms used can be prokaryotic or eukaryotic. The organisms used can be naturally occurring organisms or genetically modified. The inventive culture apparatus is also suitable for using constant, periodical or conditional culture conditions. The physical and chemical characteristics of the culture media used can be chosen by the user. The requirement that a population of cells proliferate exclusively in suspension in continuous culture conditions is satisfied by the periodical transfer of the organism suspension from a first culture vessel to a second culture vessel. After the transfer, the first culture vessel is subjected to a sterilising treatment and the sterilising agent is optionally neutralised, so that the first culture vessel is ready for the culture to be transferred back from the second culture vessel. The second culture vessel is then sterilised and neutralised.



(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension. Die erfindungsgemäße Kulturapparatur (2) ermöglicht die Proliferation von Zellen in Suspension über unbegrenzte Zeiträume. Durch die natürliche Selektion werden genetische Varianten angereichert, die zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepaßt sind. Dabei können die verwendeten Organismen prokaryontisch oder eukaryontisch sein. Darüber hinaus können die verwendeten Organismen natürlich vorkommend oder genetisch verändert sein. Die erfindungsgemäße Kulturapparatur ist ferner zur Verwendung konstanter, periodischer oder konditionaler Kulturbedingungen geeignet. Physikalische und chemische Charakteristika der benutzten Kulturmedien können vom Benutzer gewählt werden. Die Anforderung, daß eine Population von Zellen unter kontinuierlichen Kulturbedingungen ausschließlich in Suspension profiliert, wird durch periodische Überführung der Organismensuspension aus einem ersten Kulturgefäß in ein zweites Kulturgefäß erfüllt. Nach der Überführung wird das erste Kulturgefäß einer sterilisierenden Behandlung unterzogen, das sterilisierende Agens gegebenenfalls neutralisiert, so daß dann das erste Kulturgefäß für die Rücküberführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß bereit ist. Anschließend kann das zweite Kulturgefäß sterilisiert und neutralisiert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren und Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren sowie eine Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension.

Herkömmlicherweise wird zwischen seriellen und kontinuierlichen Kulturmethoden unterschieden. Bei der Technik der seriellen Kultur werden Kulturgefäße mit sterilem Wachstumsmedium mit einer Fraktion einer Kultur beimpft, die unter den gleichen Wachstumsbedingungen angezogen wurde. Dieser Zyklus wird wiederholt, wenn die neue Kultur gewachsen ist (Lenski, R.E. und Travisano, M. (1994): Dynamics of adaption and

diversification: A 10,000-generation experiment with bacterial populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6808-6814). Die in der Literatur beschriebenen Experimente zur Proliferation mikrobieller Organismen über die längsten Zeiträume wurden mit dieser Methode durchgeführt (Lenski und Travisano, a.a.O.). Bei kontinuierlichen Kulturmethoden (Dijkuizen, D.E. (1993): Chemostats used for studying natural selection and adaptive evolution. Meth. Enzymol. 224, 613-631), wird eine Kultur kontinuierlich nach einem vorgewählten Regime mit frischem Wachstumsmedium verdünnt. In der Literatur sind solche Experimente nur von begrenzter Dauer beschrieben (Dijkuizen, a.a.O.).

Die vorstehend beschriebenen herkömmlichen Techniken haben insbesondere den Nachteil, daß bisher kein Verfahren zur kontinuierlichen Kultur beschrieben wurde, das die permanente Proliferation von Organismen in Suspension gewährleistet. Alle beschriebenen Apparaturen selektionieren verdünnungsresistente (statische) Varianten, welche innere Oberflächen der Apparatur besiedeln (Chao, L. and Ramsdell, G. (1985): The effects of wall populations on coexistence of bacteria in the liquid phase of chemostat cultures. J. Gen. Microbiol. 131, 1229-1236). Diese Varianten bilden eine Subpopulation, die den adaptiven Zwängen entkommt, die auf die Organismen in Suspension wirken. Kontinuierliche Kulturen mit konstanter Zelldichte, wie z.B. Turbidostat sind besonders anfällig für eine Invasion durch verdünnungsresistente Varianten und können nur über relativ kurze Zeiträume (etwa 200 Generationen) durchgeführt werden. Die Literatur beschreibt diese Schwierigkeiten, hat aber bisher nur untaugliche Lösungsmöglichkeiten angeboten. Aus diesem Grunde werden derartige Verfahren für wissenschaftliche und industrielle Ziele praktisch nicht angewendet, obwohl ihr Potential sehr früh erkannt wurde (Monod,

J. (1950): La technique de la culture continue. Théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79, 390-410; Novick, A. and Szilard, L. (1950): Description of the chemostat. Science 112, 715-716). Die serielle Kultur, die man mit der periodischen Erneuerung der Kulturapparatur - in diesem Fall eines einfachen Kulturgefäßes - beschreiben kann, vermeidet die Invasion mit solchen verdünnungsresistenten Varianten. Sie ist jedoch arbeitsaufwendig, d.h. personalintensiv und durch wiederholte Manipulation unter Bedingungen, die absolute Sterilität erfordern, kontaminationsanfällig (Lenski und Travisano, a.a.O.). Robotisierung der seriellen Kultur in einer sterilen Umgebung könnte diese Risiken reduzierten. Sie würde jedoch mit einem großen Aufwand an Kulturgefäßen erkauft und wäre durch die Aufrechterhaltung der mechanischen Präzision des Roboters und die Aufrechterhaltung der sterilen Umgebung limitiert.

Es ist daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren und eine verbesserte Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension zur Verfügung zu stellen. Diese Aufgabe wird mit den Merkmalen der Patentansprüche gelöst.

Dabei geht die Erfindung von den Grundgedanken aus, daß die Vorrichtung eine Suspension von Zellen dauernd in Proliferation hält. In keinem Teil der Apparatur darf eine verdünnungsresistente Variante akkumulieren. Ihre Funktion wird durch die Steuerung von Flüssigkeitsströmen (Fluidics) gewährleistet. Unter der Voraussetzung, daß die regelmäßige Nachlieferung von Flüssigkeiten, wie z.B. Nährmedien und Waschlösungen, und eine kontinuierliche Versorgung mit sterilen Gasen, wie z.B. Luft gewährleistet wird, muß die Apparatur über unbegrenzte Zeitdauer autonom arbeiten. Verschie-

dene Kulturregime, wie z.B. Chemostat oder Turbidostat, können angewendet werden. Bei Bedarf können bestimmte Bestandteile von Zellen durch die Wirkung geeigneter Lösungen abgetrennt oder isoliert werden. Bei Bedarf können mehrere der Apparaturen so miteinander verbunden werden, daß der Inhalt oder ein Teil des Inhalts einer Apparatur in eine andere überführt werden kann.

Konkret wird die Anforderung, daß eine Population von Zellen unter kontinuierlichen Kulturbedingungen ausschließlich in Suspension profiliert, durch vorzugsweise periodische Überführung der Organismensuspension aus einem ersten Kulturgefäß in ein zweites Kulturgefäß erfüllt. Nach der Überführung wird das erste Kulturgefäß einer sterilisierenden Behandlung unterzogen, das sterilisierende Agens gegebenenfalls neutralisiert, und das erste Kulturgefäß ist dann wiederum bereit für die Rücküberführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß, das anschließend der Sterilisation und Neutralisation unterzogen wird. Dieser Ablauf stellt dabei sicher, daß (i) die Population von Organismen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten bleibt und (ii) alle verdünnungsresistenten Varianten in irgend einem Teil der Apparatur während jedem der Zyklen zerstört werden.

Das Verfahren der alternierenden Sterilisierung der Kulturgefäße selektioniert vorzugsweise direkt und regelmäßig gegen variante Organismen, die Oberflächen in der Apparatur besiedeln und verhindert die Proliferation und Adaption einer statischen, verdünnungsresistenten Population. Jede Vorrichtung zur kontinuierlichen Kultur von Organismen kann als Apparatur betrachtet werden, in der die natürliche Selektion Mutanten bevorzugt, die der Verdünnung widerstehen. Das beschriebene Verfahren bietet der kultivierten Population als einzige

Möglichkeit durch eine Erhöhung der Proliferationsrate in Suspension der Verdünnung zu widerstehen. Im Unterschied zu einem Fermentationsverfahren beschreibt die Erfindung ein Verfahren der automatisierten Genetik, das gleichzeitig statische Varianten gegenselektioniert und dynamische Varianten bevorzugt, die immer besser an die Kulturbedingungen angepaßt sind.

Somit hat die vorliegende Erfindung gegenüber dem Stand der Technik insbesondere den Vorteil, daß ein Regime konstanter Zelldichte (Turbidostat) über unbegrenzte Zeiträume aufrechterhalten werden kann und daß die Wachstumsrate natürlich vorkommender oder gentechnisch veränderter Zellen erhöht werden kann. Ein Beispiel für industrielle Anwendungen ist die Anreicherung natürlicher Varianten, die ein chemisches Produkt (wie z.B. ein Zwischenprodukt chemischer Synthese oder ein Umweltgift) metabolisieren können. Ein weiterer Fall wäre die Verbesserung eines Enzyms oder eines Stoffwechselweges: wenn die Umwandlung eines Substrats in ein Produkt der limitierende Schritt im Stoffwechsel einer Zelle ist und die Zelle mit diesem Substrat im Überschuß versorgt werden kann, so wird die kontinuierliche Kultur unter den beschriebenen Bedingungen zu einer Zunahme der Wachstumsrate führen, die aus einer erhöhten Umsatzrate des Substrats resultiert, und diese erhöhte Umsatzrate resultiert aus der Fixierung von aufeinanderfolgenden Mutationen in dem Gen oder den Genen für die Enzyme, die für den zu leistenden Umsatz des Substrats der Selektion unterliegen.

Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, daß mehrere verschiedene Wachstumsmedien der Organismensuspension durch die Apparatur zugeführt werden können. Dies erlaubt, vielfache oder alternierende Adaption durchzuführen und die metabolische Kapazität der kultivierten Organismen zu diversi-

fizieren. Eine vorgewählte Zelldichte kann von anderen Variablen als der Zufuhr frischen Mediums abhängig gemacht werden. Das Erreichen dieser Dichte kann die Wirkung chemischer und physikalischer Agenzien konditionieren, deren Toxizität derart eingestellt ist, daß die Population der Organismen ständig an ihrer Toleranzgrenze ist oder daß zunehmend resistente Varianten selektioniert werden. Zudem können durch die Zufuhr von Detergenzien oder Lösungsmitteln bestimmte Bestandteile von Zellen extrahiert werden. Insbesondere können genetisches Material wie Plasmide oder Viren automatisch extrahiert werden, wobei die Wirtszellen zerstört werden. Auf der anderen Seite können bestimmte Agenzien zugeführt werden, die die Zellen kompetent für genetische Transformation oder Infektion mit natürlichen oder synthetisch hergestellten Nucleinsäuren machen. Dieses genetische Material kann dann in die Population eingeführt werden. Ganz allgemein können zwei oder mehrere Apparaturen miteinander verbunden werden. Damit können verschiedene Organismen automatisch in Kontakt gebracht werden und es können automatisch verschiedenste genetische Materialien, wie z.B. konjugative Episomen, Phagen, Transposons, usw. eingeführt werden.

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand einer bevorzugten Ausführungsform beispielhaft unter Bezugnahme auf die Zeichnungen beschrieben. Darin zeigen:

Fig. 1 eine erfindungsgemäße Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension in einer Ausgangsposition, in der sich die Zellsuspensionen in einem ersten Kulturgefäß befindet;

Fig. 2 die Vorrichtung von Fig. 1, bei der sich die Zellsuspension in einem zweiten Kulturgefäß befindet;

Fig. 3 die Vorrichtung von Fig. 2, wobei das erste Kulturgefäß ein sterilisierendes Agens aufweist;

Fig. 4 die Sterilisierung einzelner Leitungsabschnitte;

Fig. 5 die Vorrichtung beim Entfernen des sterilisierenden Agens aus dem ersten Kulturgefäß sowie den dazugehörigen Leitungsabschnitten;

Fig. 6-8 Schritte zur Entfernung und Neutralisierung von Resten des sterilisierenden Agens aus dem ersten Kulturgefäß und den dazugehörigen Leitungsabschnitten mit einer Waschlösung;

Fig. 9 die Vorrichtung von Fig. 3, bei der das erste Kulturgefäß und die dazugehörigen Leitungsabschnitte sterilisiert und neutralisiert sind; und

Fig. 10-16 die entsprechend umgekehrte Vorgehensweise zur Überführung der Kultur aus dem zweiten Kulturgefäß in das erste Kulturgefäß.

Die in den Figuren 1 bis 16 dargestellte Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension kann auch als Kulturapparatur 2 bezeichnet werden. Die Kulturapparatur 2 ermöglicht die Proliferation von Zellen in Suspension über unbegrenzte Zeiträume. Durch die natürliche Selektion werden genetische Varianten angereichert, die zunehmend besser an die gewählten Kulturbedingungen angepaßt sind. Die verwendeten Organismen können prokaryontisch oder eukaryontisch sein. Ferner können die verwendeten Organismen natürlich vorkommend oder genetisch verändert sein. Konstante (Kubitschek, H.E. (1970): Introduction to research with continuous cultures. Prentice-Hall; Pirt, S.J. (1975): Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell), periodische (Pirt, a.a.O.) oder konditionale (Bryson, V. (1952): The turbidostatic selector - a device for automated isolation of bacterial variants. Science 116, 48-51; Fraleigh, S.P.,

Bungay, H.R. and Clesceri, L.S. (1989): Continuous culture, feedback and auxostats. TIBTech. 7, 159-164) Kulturbedingungen können verwendet werden. Physikalische und chemische Charakteristika der benutzten Kulturmedien können vom Benutzer gewählt werden.

Der Aufbau und das Funktionsschema der Kulturapparatur 2 wird nachstehend anhand der Figuren 1 bis 16 beschrieben. Die Kulturapparatur 2 weist im wesentlichen ein erstes Kulturgefäß 4 und ein zweites Kulturgefäß 6 auf. Die beiden Kulturgefäße 4 und 6 sind über Leitungen 8 bzw. 10, die vorzugsweise in den unteren Bereich der Kulturgefäße 4 bzw. 6 münden, mit einer unter Überdruck stehenden Gasversorgung 12 verbunden. Des weiteren sind die Kulturgefäße 4 und 6 über Leitungen 14 und 16 jeweils mit einer ebenfalls unter Überdruck stehenden Mediumsquelle 18 verbunden. Die Leitungen 14 und 16 münden vorzugsweise von der Mediumsquelle 18 kommend jeweils in die Leitungen 8 bzw. 10 zur Verbindung der Gasversorgung 12 mit den beiden Kulturgefäßen 4 bzw. 6. Darüber hinaus ist eine unter Überdruck stehende Quelle 20 für ein sterilisierendes Agens 21 (z.B. NaOH) vorgesehen, die mittels Leitungen 22 und 24 mit den jeweiligen Kulturgefäßen 4 bzw. 6 in Verbindung steht. Vorzugsweise münden die Leitungen 22 und 24 in die Leitungen 8 und 10, wie vorstehend für die Leitungen 14 und 16 beschrieben.

An den Kulturgefäßen 4 und 6 ist ferner jeweils eine Ablaßleitung 26 bzw. 28 vorgesehen, um überschüssiges sterilisierendes Agens 21 bzw. Waschlösungen 19 während der Sterilisation und Neutralisation des jeweiligen Kulturgefäßes 4 oder 6 abzuführen. Des weiteren sind Verbindungsleitungen 30, 31, 32 und 33 zwischen den beiden Kulturgefäßen 4 und 6 vorgesehen, um die beiden Kulturgefäße 4 und 6 miteinander in Verbindung

zu bringen. Vorzugsweise weisen mindestens zwei der Verbindungsleitungen einen gemeinsamen Abschnitt 34 und 35 auf, an dem eine Ablaßleitung 36 vorgesehen ist, die der vollständigen Entleerung eines der beiden Kulturgefäße 4 oder 6 oder der Entnahme der Kultur 38 oder eines Teils davon dient.

Zur Steuerung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension sind ferner in den Leitungen oder Leitungsabschnitten 14, 16, 22, 24, 30, 31, 32, 33, 34, 35 und 36 Ventile (schematisch dargestellt) vorgesehen. Die Ventile können beispielsweise mechanisch betätigt werden oder aber vorzugsweise unter Verwendung einer nicht dargestellten Steuereinrichtung elektrisch bzw. elektronisch vorzugsweise automatisch angesteuert werden.

Im folgenden wird anhand der Figuren 1 bis 16 das Funktionsschema des erfindungsgemäßen Verfahrens mit der vorstehend beschriebenen Kulturapparatur 2 näher erläutert. Dazu ist anzumerken, daß abgesperrte Leitungsabschnitte dünn und durchströmte bzw. durchströmbare Leitungsabschnitte oder Leitungen dick eingezeichnet sind. Die Ventile sind lediglich schematisch dargestellt, so daß aufgrund ihrer Darstellungsform kein Rückschluß auf die verwendete Ventilart gemacht werden sollte. Ebenso ist der Leitungsplan sowie die Ventilanordnung lediglich schematisch. Geeignete Ventile sowie die bestmögliche Leitungsführung sowie Ventilanordnung können je nach Anwendungsfall variieren.

Die Figuren 1 bis 16 stellen die wichtigsten aufeinanderfolgenden Etappen im Kultivierungs/Sterilisierungszyklus dar. Gemäß Fig. 1 befindet sich die Zellsuspension unter vorgewähltem Kulturregime (Chemostat, Turbidostat) im ersten Kulturgefäß 4. Die Ventile sind dabei so angesteuert, daß das er-

ste Kulturgefäß 4 sowohl mit der Gasversorgung 12 wie auch mit der Mediumsquelle 18 in Verbindung steht, um der Kultur 38 regelmäßig Flüssigkeiten, wie z.B. Nährmedien und Waschlösungen nachzuliefern und eine kontinuierliche Versorgung mit sterilen Gasen, wie z.B. Luft, zu gewährleisten. Die Verbindung des ersten Kulturgefäßes 4 zur Quelle 20 für das sterilisierende Agens 21 ist durch das entsprechende Ventil unterbrochen. Das zweite Kulturgefäß 6 hat eine Verbindung zur Gasquelle 12. Durch die Leitung 36 kann die Kultur 38 oder Teile davon entnommen werden.

Entsprechend Fig. 2 ist die Kultur 38 über die Leitungen 32, 34, 35 und 33 in das zweite Kulturgefäß 6 überführt worden, wobei das Öffnen der Leitung 28 einen Druckausgleich gewährleistet. Alle von der Mediumsquelle 18 und der Quelle 20 des sterilisierenden Agens zu den Kulturgefäßen 4 und 6 führenden Leitungen sind abgesperrt.

In der in Fig. 3 dargestellten Situation ist nach Absperren der Leitungen 32, 34, 35 und 33 und Öffnen der Leitungen 22 und 26 das erste Kulturgefäß 4 mit sterilisierendem Agens 21 gefüllt worden; ein Überschuß an sterilisierendem Agens 21 wird über die Ablaßleitung 26 abgeführt. Die Kultur 38 im zweiten Kulturgefäß 6 kann nach Herstellung der Verbindung 16 zwischen der Mediumsquelle 18 und dem Kulturgefäß 6 sowie Absperren der Leitung 28 und Öffnen der Leitungsabschnitte 31, 33, 35 und 36 wieder regelmäßig mit Medium versorgt werden.

Fig. 4 zeigt die Sterilisierung der Leitungen 30, 34 und 36 durch sterilisierendes Agens 21 nach Öffnen der entsprechenden Leitungsabschnitte und Schließen der Ablaßleitung 26.

Das sterilisierende Agens 21 wird nun gemäß Fig. 5 nach Absperren der Leitungen 22, 26 und 30 sowie Öffnen der Leitung 32 aus dem ersten Kulturgefäß 4 entfernt.

Die Figuren 6 bis 8 zeigen vorzugsweise optionale Schritte zur Entfernung und Neutralisierung von eventuell verbliebenen Resten des sterilisierenden Agens 21 aus dem ersten Kulturgefäß 4 und den dazugehörigen Leitungsabschnitten durch frisches Medium:

In Fig. 6 wird das erste Kulturgefäß 4 nach Schließen der Leitungen 32 und 36 und Öffnen der Leitung 26 durch Öffnen der Leitung 14 mit Medium gefüllt, überschüssiges Medium wird durch die Ablaßleitung 26 abgeführt. Analog der Situation in Fig. 4 werden nun die Leitungen 30, 34 und 36 mit Medium durchspült (Fig. 7), um dann das Medium analog der Situation in Fig. 5 aus dem Kulturgefäß zu entfernen (Fig. 8).

Nach dem Öffnen der Leitung 26 und Schließen der Leitungen 32 und 34 des Kulturgefäßes 4 ergibt sich eine Situation, die der in Fig. 1 dargestellten spiegelsymmetrisch ist, wobei sich die Zellsuspension nun im zweiten Kulturgefäß 6 befindet. Durch die Leitung 36 kann die Kultur 38 oder Teile davon entnommen werden.

Die Figuren 10 bis 16 stellen die entsprechenden symmetrischen Schritte dar, um zur Ausgangssituation in Fig. 1 zurückzukehren, nämlich: Fig. 10, Überführung der Kultur 38 aus dem zweiten Kulturgefäß 6 in das erste Kulturgefäß 4; Fig. 11, Sterilisieren des zweiten Kulturgefäßes 6 mit sterilisierendem Agens 21; Fig. 12, Sterilisieren der Leitungsabschnitte 31, 35 und 36; Fig. 13, Entfernen des sterilisierenden Agens 21 über die Leitungsabschnitte 33, 35 und 36; Fig. 14, Waschen des

Kulturgefäßes 6 und der Ablaßleitung 28 mit frischem Medium; Fig. 15, Waschen der Leitungen 31, 35 und 36 durch frisches Medium und Fig. 16, Entfernen des zum Waschen verwendeten Mediums über die Leitungen 33, 35 und 36. Öffnen der Leitung 14 zum Kulturgefäß 4, Öffnen der Leitungen 30 und 34 und Schließen der Leitungen 26 sowie Öffnen der Leitung 28 und Schließen der Leitungsabschnitte 33 und 35 stellt die Ausgangssituation von Fig. 1 wieder her.

Anzumerken ist, daß zu jedem Zeitpunkt des vorstehend beschriebenen Verfahrens, zu dem die Ablaßleitung 36 nicht von sterilisierendem Agens durchströmt wird, ein Abführen der Kultur 38 durch den jeweiligen Verbindungsabschnitt und die Ablaßleitung 36 gewährleistet ist.

Des weiteren ist die vorliegende Erfindung nicht auf die Verwendung zweier Kulturgefäße 4 und 6 beschränkt, sondern es können auch mehrere Kulturgefäße, z.B. in Serienschaltung und/oder in Parallelschaltung angeordnet sein, so daß mehrere erste Kulturgefäße 4_i und mehrere zweite Kulturgefäße 6_i vorhanden sind.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wäre es möglich, außer dem ersten und zweiten Kulturgefäß mindestens ein weiteres Kulturgefäß vorzusehen, um z.B. ein bereits verwendetes sterilisierendes Agens 21, das jedoch nochmals verwendet werden könnte, zwischenzuspeichern. Auch für etwaige Zwischenschritte wäre es denkbar, ein weiteres Kulturgefäß vorzusehen.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension mit:
 (a) mindestens einem ersten und mindestens einem zweiten Kulturgefäß (4, 6) zur Aufnahme einer Kultur (38);
 (b) einer Gasquelle (12);
 (c) einer Mediumsquelle (18);
 (d) einer Quelle (20) für ein sterilisierendes Agens (21); und
 (e) einem Leitungssystem mit Mitteln zum wahlweisen Verbinden eines der beiden Kulturgefäße (4 oder 6) mit der Mediumsquelle (18) sowie der beiden Kulturgefäße (4, 6) miteinander und zum wahlweisen Verbinden des entsprechend anderen Kulturgefäßes (4 oder 6) mit der Quelle (20) für das sterilisierende Agens (21).

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Mittel zum wahlweisen Verbinden Ventile sind.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, wobei zwischen den beiden Kulturgefäßen (4, 6) zwei Verbindungsleitungen (30, 32) vorgesehen sind, die einen gemeinsamen Leitungsabschnitt (34) aufweisen.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, wobei am gemeinsamen Leitungsabschnitt (34) eine Ablaßleitung (36) vorgesehen ist, durch die Kulturen (38) aus den Kulturgefäßen (4, 6) entnehmbar sind.

5. Vorrichtung nach Anspruch 3 oder 4, wobei eine der Verbindungsleitungen (32) an einem unteren Bereich der Kulturgefäße (4, 6) und die andere der Verbindungsleitungen

(30) an einem oberen Bereich der Kulturgefäße (4, 6) angeschlossen ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei Leitungen (14, 16) von der Mediumsquelle (18) und/oder Leitungen (22, 24) von der Quelle (20) für das sterilisierende Agens (21) in jeweils eine dem jeweiligen Kulturgefäß (4, 6) zugeordnete, von der Gasquelle (12) kommende Leitung (8, 10) münden.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Leitungen des Leitungssystems, die mit der Gasquelle (12), der Mediumsquelle (18) und/oder der Quelle (20) in Verbindung stehen, unter Überdruck stehen.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei eine eigene, absperrbare Ablaßleitung (26, 28) für jedes der Kulturgefäße (4, 6) vorgesehen ist.

9. Vorrichtung nach Anspruch 8, wobei die Ablaßleitungen (26, 28) aus dem oberen Bereich der Kulturgefäße (4, 6) münden und/oder von der Verbindungsleitung (30) abzweigen.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Mittel zum Verbinden der Leitungen des Leitungssystems elektrisch und/oder elektronisch ansteuerbar sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei mehrere erste Kulturgefäße (4_i) und/oder mehrere zweite Kulturgefäße (6_i) in Parallelschaltung vorgesehen sind.

12. Verfahren zur Selektion beschleunigter Proliferation lebender Zellen in Suspension mit den Schritten:

(a) Bereitstellen einer Kultur (38) in mindestens einem ersten Kulturgefäß (4);

(b) kontinuierliches Versorgen der Kultur (38) im ersten Kulturgefäß (4) mit Gas von einer Gasquelle (12) und regelmäßiges Nachliefern von Flüssigkeiten von einer Mediumsquelle (18);

(c) Überführen der Kultur (38) aus dem ersten Kulturgefäß (4) durch Verbindungsleitungen (32 - 35) in mindestens ein zweites Kulturgefäß (6) mittels entsprechender Leitungsschaltung;

(d) Verbinden des ersten Kulturgefäßes (4) mit einer Quelle (20) für ein sterilisierendes Agens (21), um das erste Kulturgefäß (4) zu sterilisieren;

(e) Entfernen des sterilisierenden Agens (21) aus dem ersten Kulturgefäß (4);

(f) kontinuierliches Versorgen der Kultur (38) im zweiten Kulturgefäß (6) mit Gas von der Gasquelle (12) und regelmäßiges Nachliefern von Flüssigkeiten von der Mediumsquelle (18);

(g) Rückführen der Kultur (38) aus dem zweiten Kulturgefäß (6) durch die Verbindungsleitungen (32 - 35) in das erste Kulturgefäß (4) mittels entsprechender Leitungsschaltung;

(h) Verbinden des zweiten Kulturgefäßes (6) mit der Quelle (20) für das sterilisierende Agens (21), um das zweite Kulturgefäß (6) zu sterilisieren;

(i) Entfernen des sterilisierenden Agens (21) aus dem zweiten Kulturgefäß (6);

(j) gegebenenfalls Wiederholen der Schritte (b) bis (h).

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei die dem jeweiligen Kulturgefäß (4, 6) zugeordneten Leitungsabschnitte durch entsprechende Leitungsschaltung sterilisiert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei Reste des sterilisierenden Agens (21) in den Leitungsabschnitten oder dem Kulturgefäß (4, 6) nach der Sterilisation neutralisiert werden.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei zu jedem Zeitpunkt, zu dem kein sterilisierendes Agens (21) abgeführt wird, Kulturen (38) aus der Kulturapparatur (2) abgeführt werden können.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei die Überführung der Kulturen (38) von einem Kulturgefäß (4 oder 6) in das andere Kulturgefäß (4 oder 6) periodisch erfolgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 15, wobei das Überführen der Kulturen (38) von einem Kulturgefäß (4 oder 6) in das andere Kulturgefäß (4 oder 6) in solchen Intervallen erfolgt, daß die Population von Organismen in Suspension zu jedem Zeitpunkt erhalten bleibt und alle verdünnungsresistenten Varianten in irgendeinem Teil der Apparatur während jedem dieser Zyklen zerstört werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 17, wobei die Leitungsschaltung durch Ventile erfolgt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 18, wobei die Leitungsschaltung durch elektrisch und/oder elektronisch ansteuerbare Verbindungsmittel erfolgt, die mit einer Steuereinrichtung in Verbindung stehen.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 19, wobei die der Kultur (38) zugeführte Flüssigkeit Nährmedien und/oder Waschlösungen aufweist.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 20, wobei das Entfernen des sterilisierenden Agens (21) zumindest teilweise durch den Kulturgefäßen (4, 6) zugeordnete Ablaßleitungen (26, 28) erfolgt.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 21, wobei mindestens zwei der Schritte (b) bis (h) zeitüberlappend oder zeitgleich durchgeführt werden.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 22, wobei die Sterilisierung durch NaOH erfolgt.

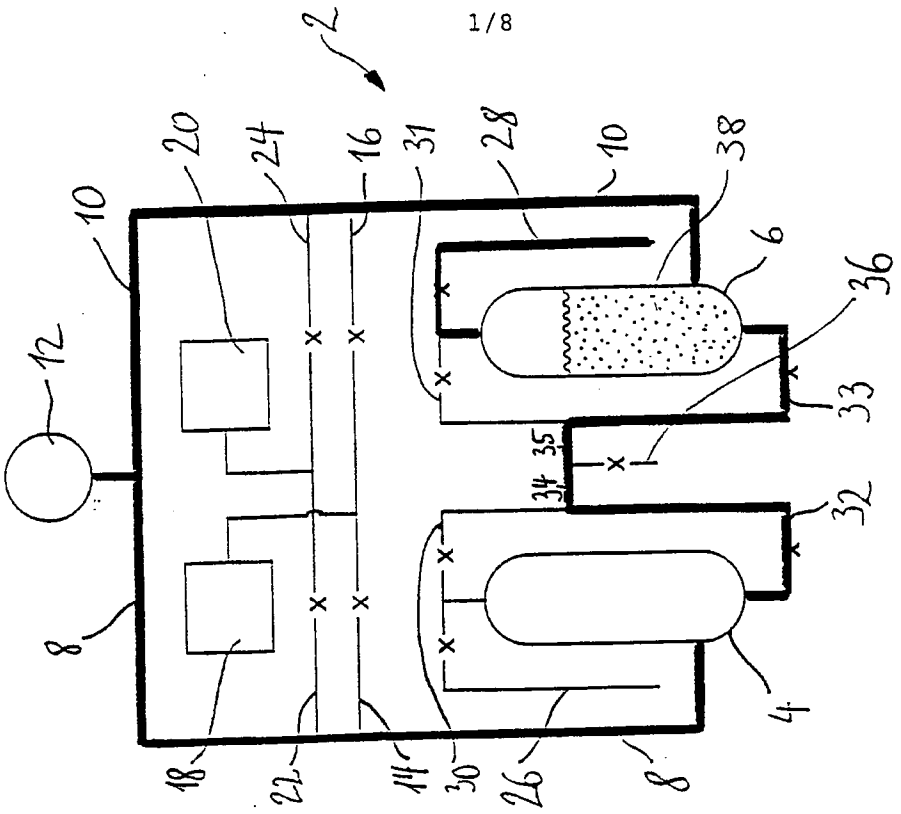

2
20
24
16
31
28
10
38
6
36
12
10
33
35
34
32
8
4
18
22
14
30
26
8

Fig. 2

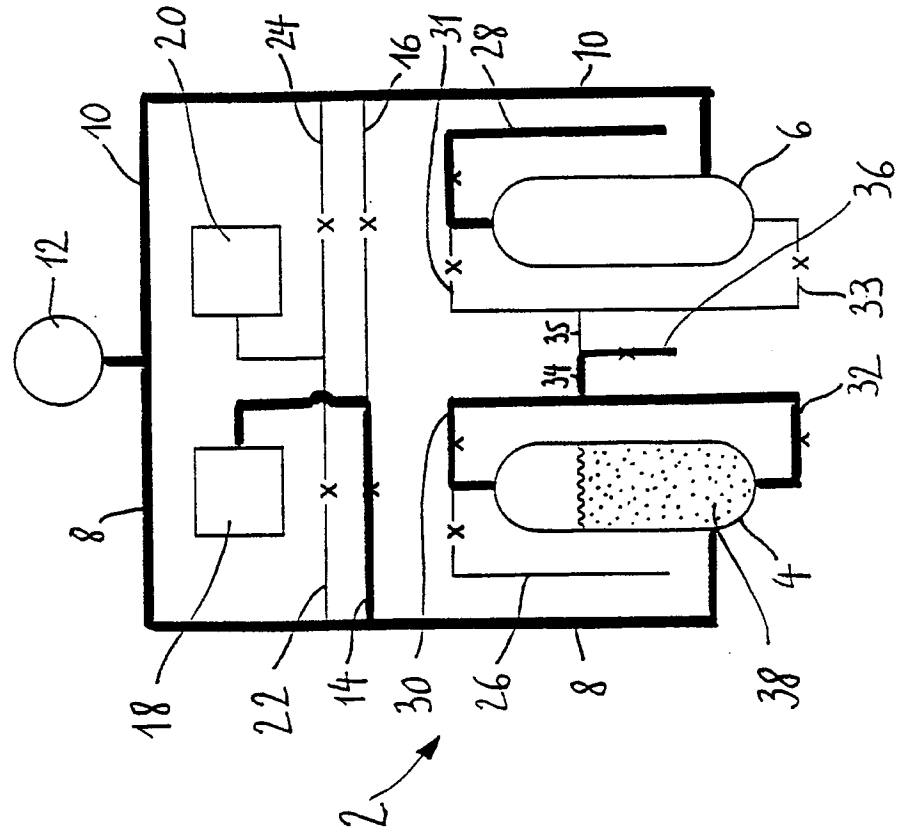

20
24
16
31
28
10
6
36
12
10
33
35
34
32
8
4
18
22
14
30
26
8
38
2

Fig. 1

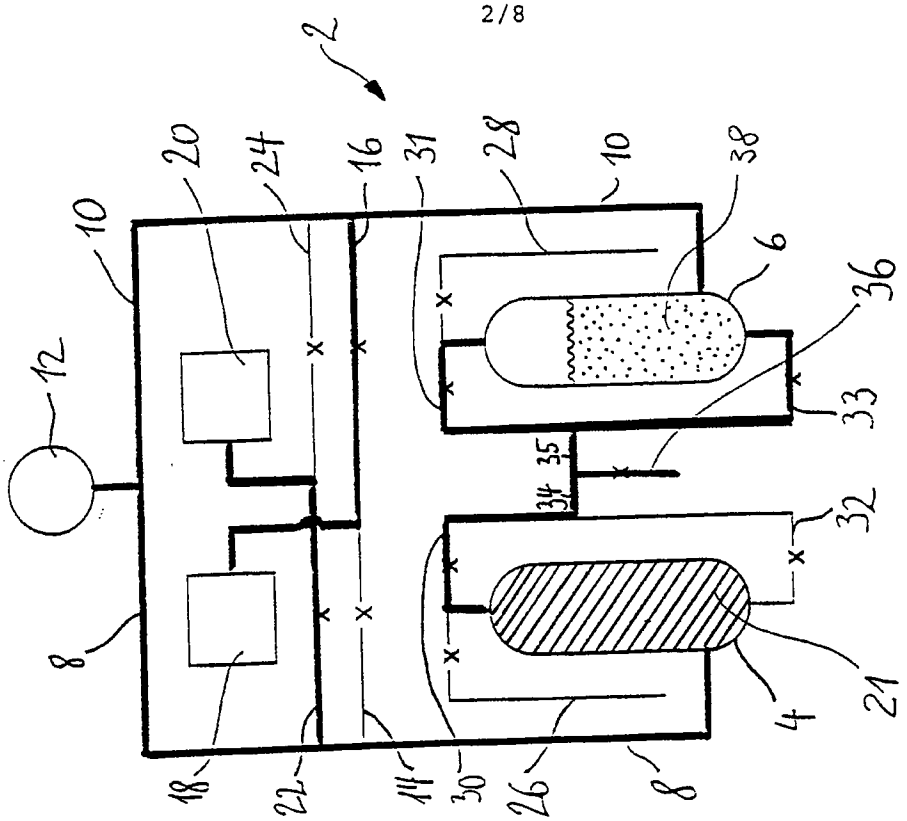

2
10
20
24
16
31
28
10
38
6
36
12
33
35
34
32
8
4
21
18
22
11
30
26
8

Fig. 4

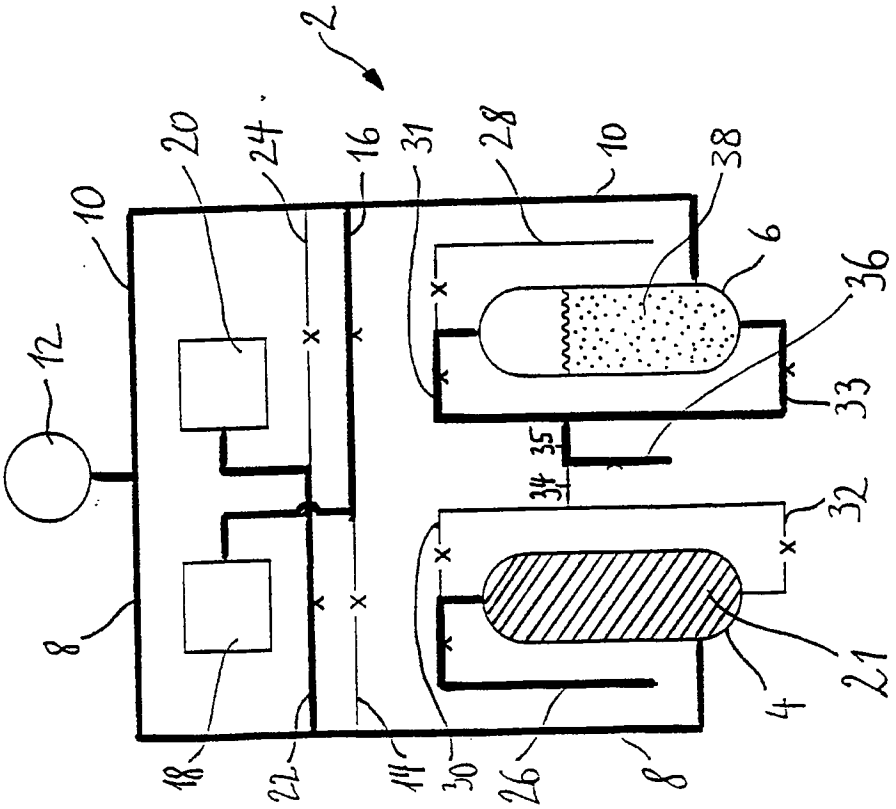

2
10
20
24
16
31
28
10
38
6
36
12
33
35
34
32
8
4
21
18
22
11
30
26
8

Fig. 3

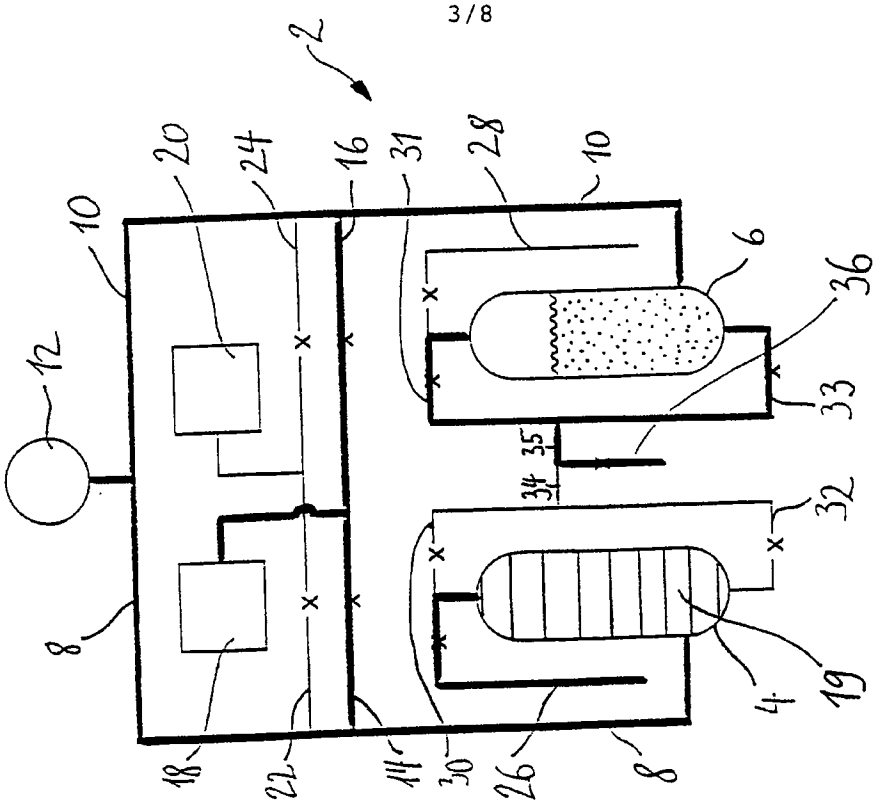

2
20
24
16
31
28
10
6
36
12
10
33
35
34
32
8
4
19
18
22
14
30
26
8

Fig. 6

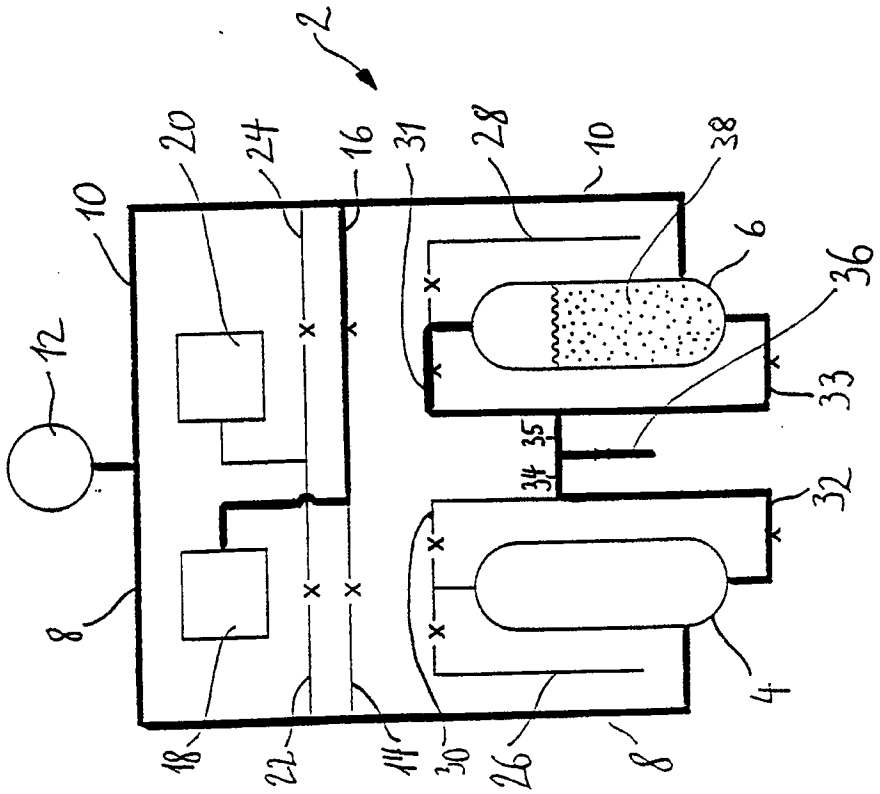

2
20
24
16
31
28
10
38
6
36
12
10
33
35
34
32
8
4
18
22
14
30
26
8

Fig. 5

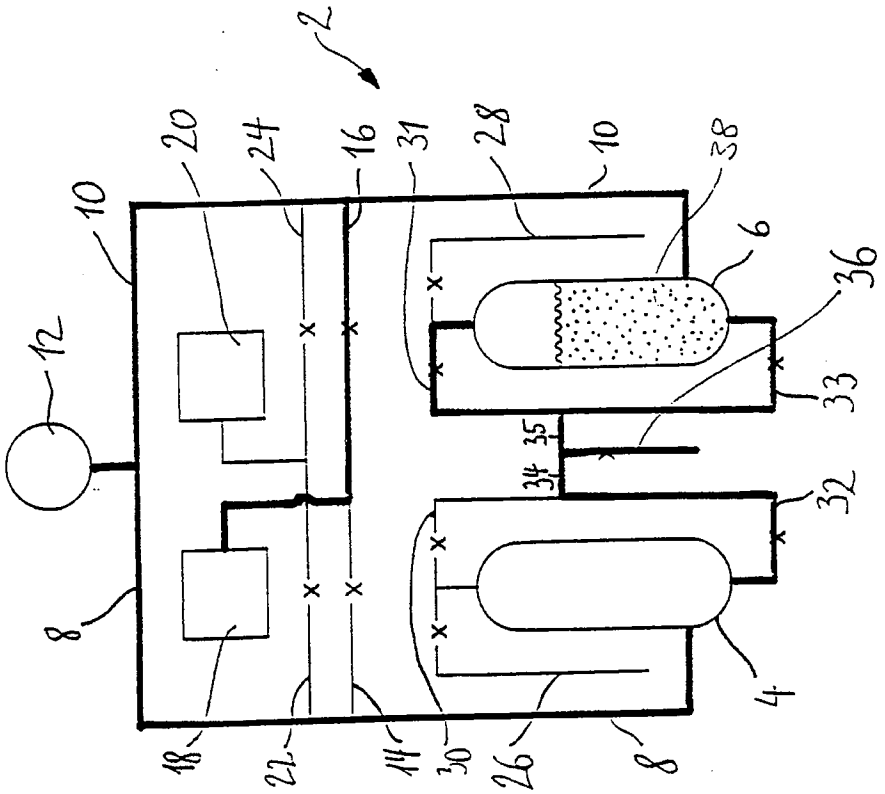

2
10
20
24
16
31
28
10
38
6
36
12
33
35
34
32
8
4
18
22
14
30
26
8

Fig. 8

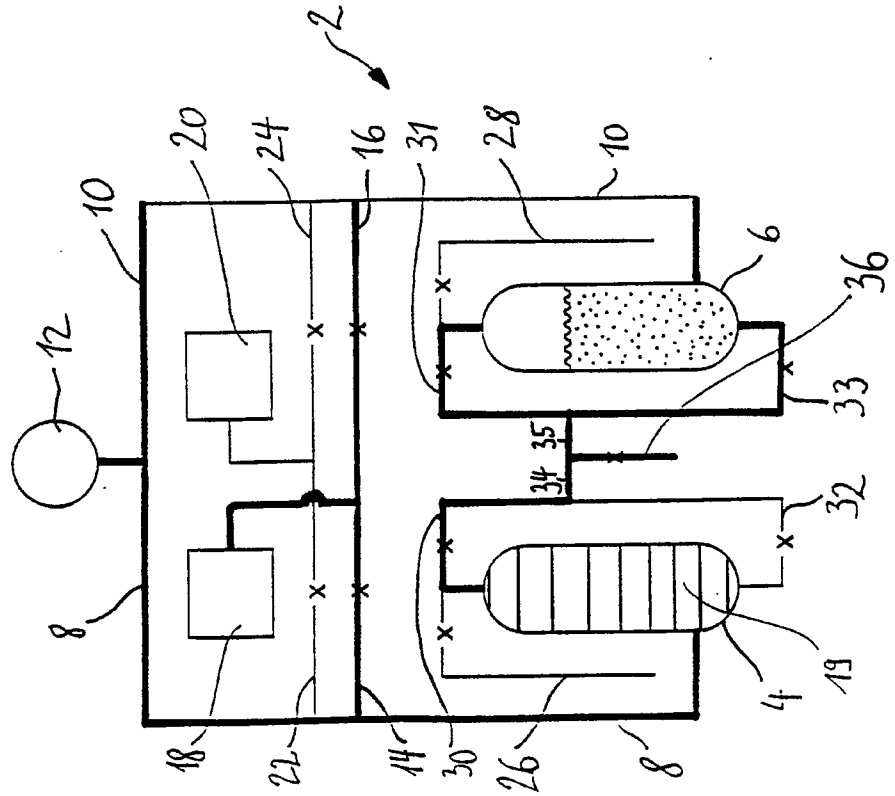

2
10
20
24
16
31
28
10
6
36
12
33
35
34
32
8
4
19
18
22
14
30
26
8

Fig. 7

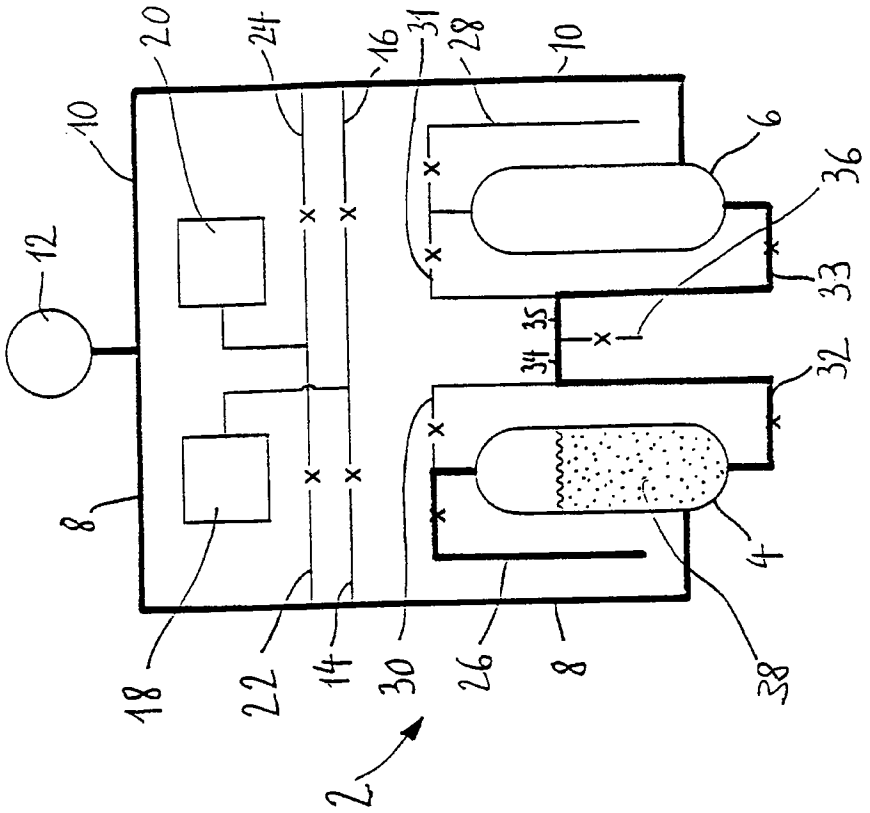

2
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
31
32
33
34
35
36
38
4
6

Fig. 10

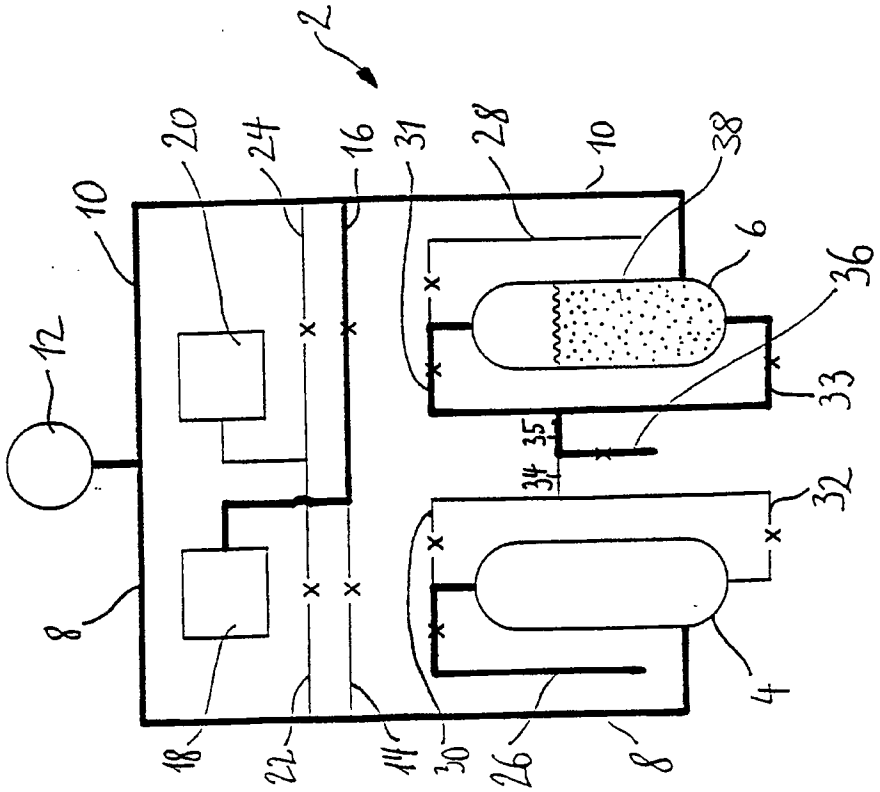

2
8
10
11
12
16
18
20
22
24
26
28
30
31
32
33
34
35
36
38
4
6

Fig. 9

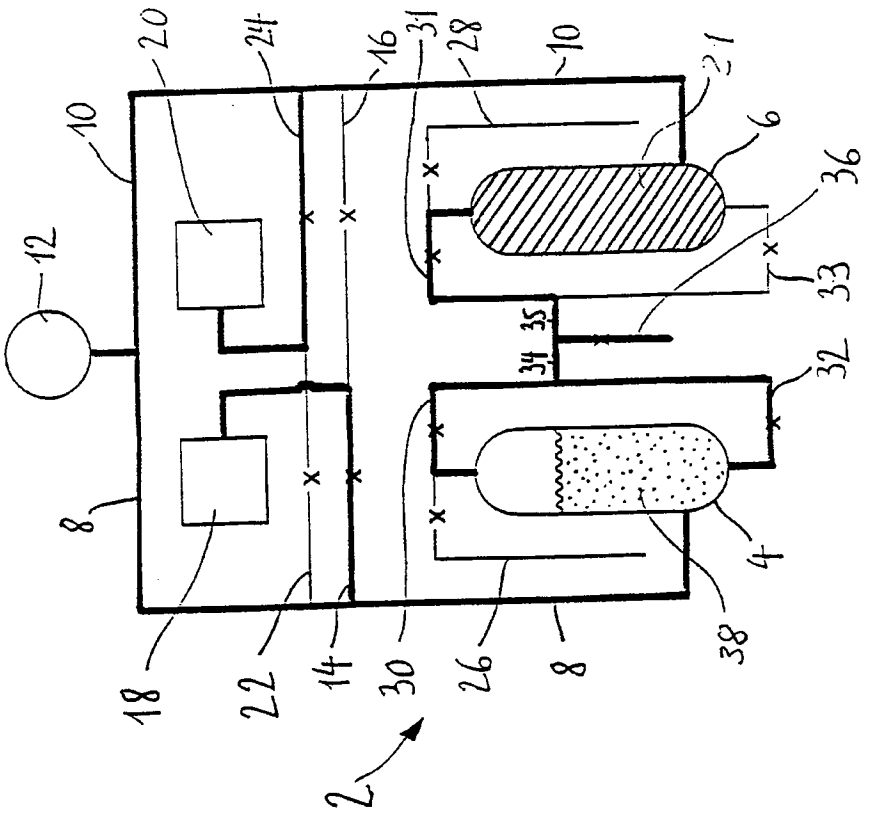

12
10
20
24
16
31
28
10
21
6
36
33
35
34
32
8
4
38
18
22
14
30
26
8
2

Fig. 12

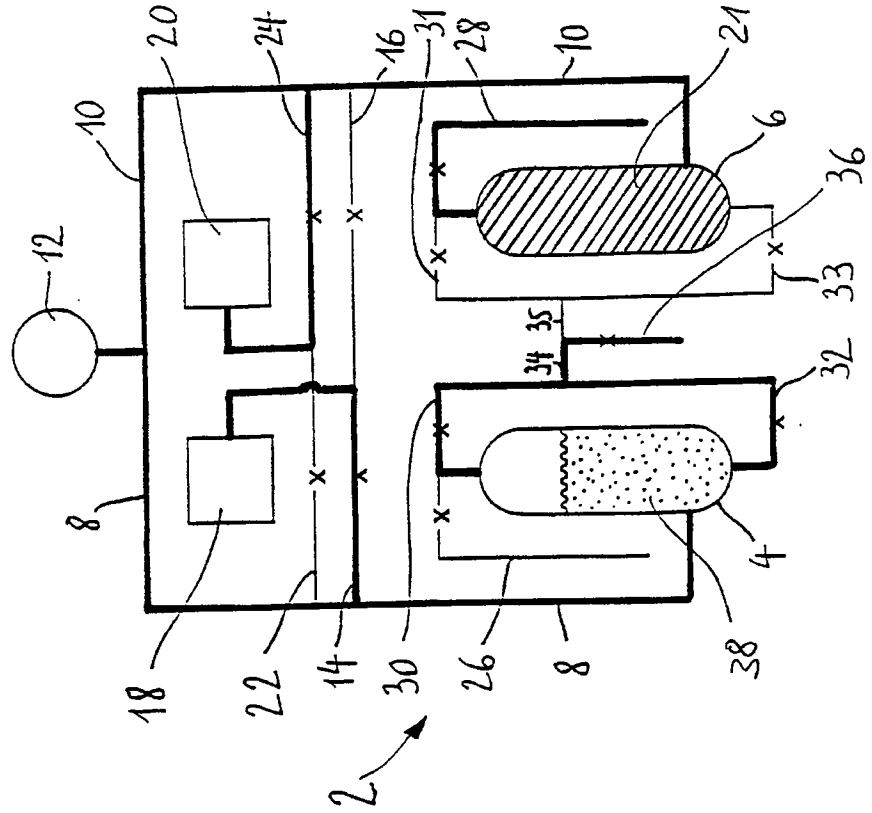

12
10
20
24
16
31
28
10
21
6
36
33
35
34
32
8
4
38
18
22
14
30
26
8
2

Fig. 11

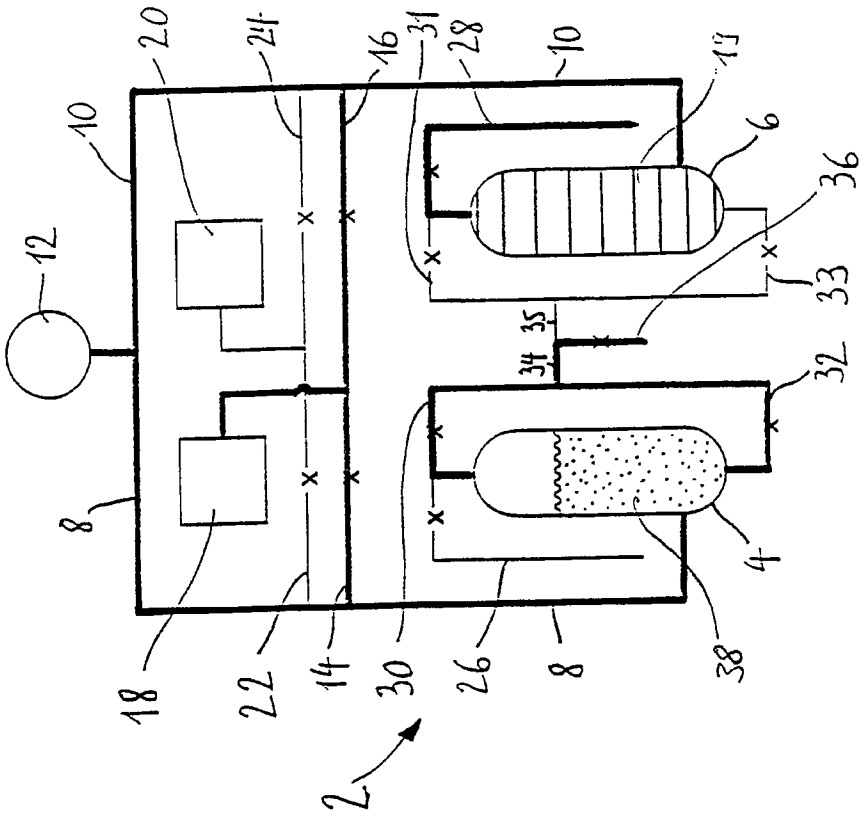

2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
31
32
33
34
35
36
38

Fig. 14

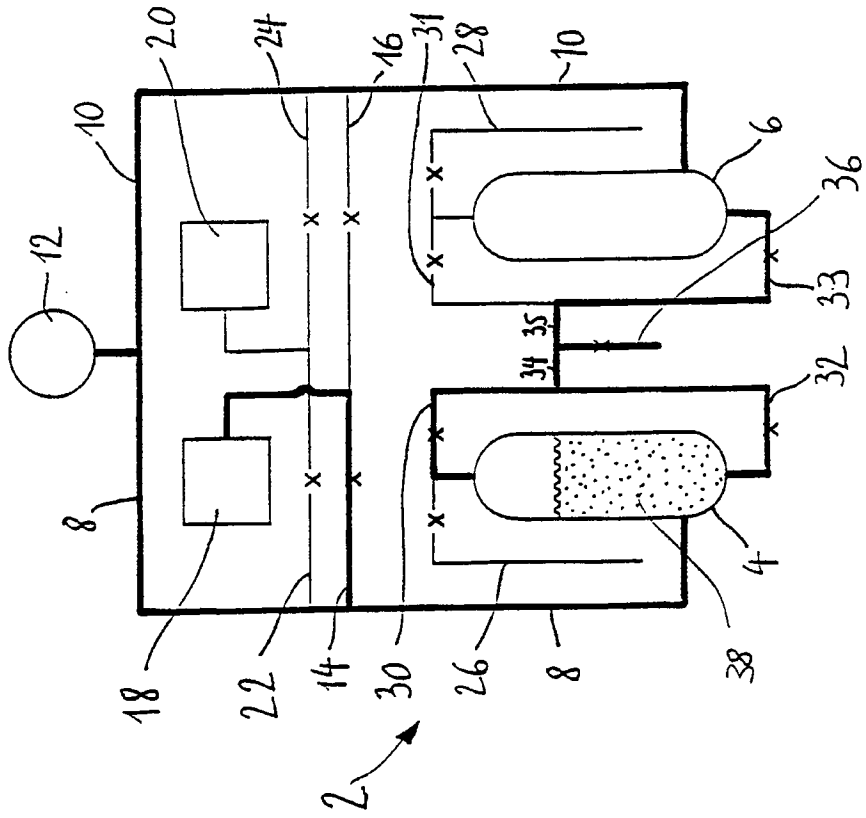

2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
31
32
33
34
35
36
38

Fig. 13

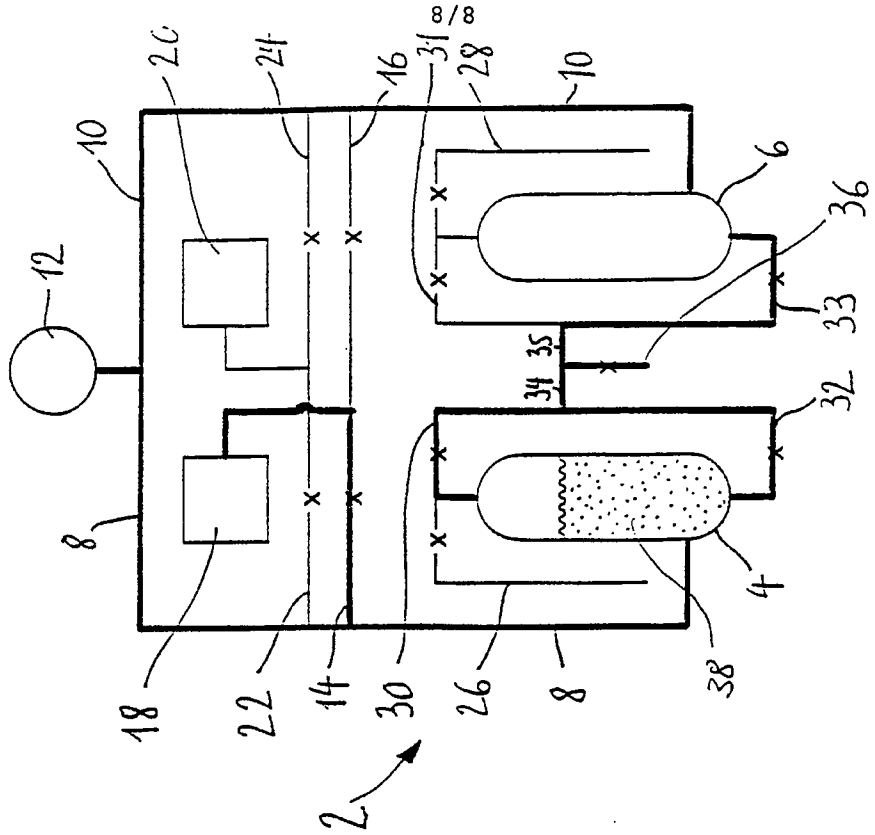

20
24
16
31
28
10
6
36
33
35
34
32
12
10
8
4
18
22
14
30
26
8
38
2

Fig. 16

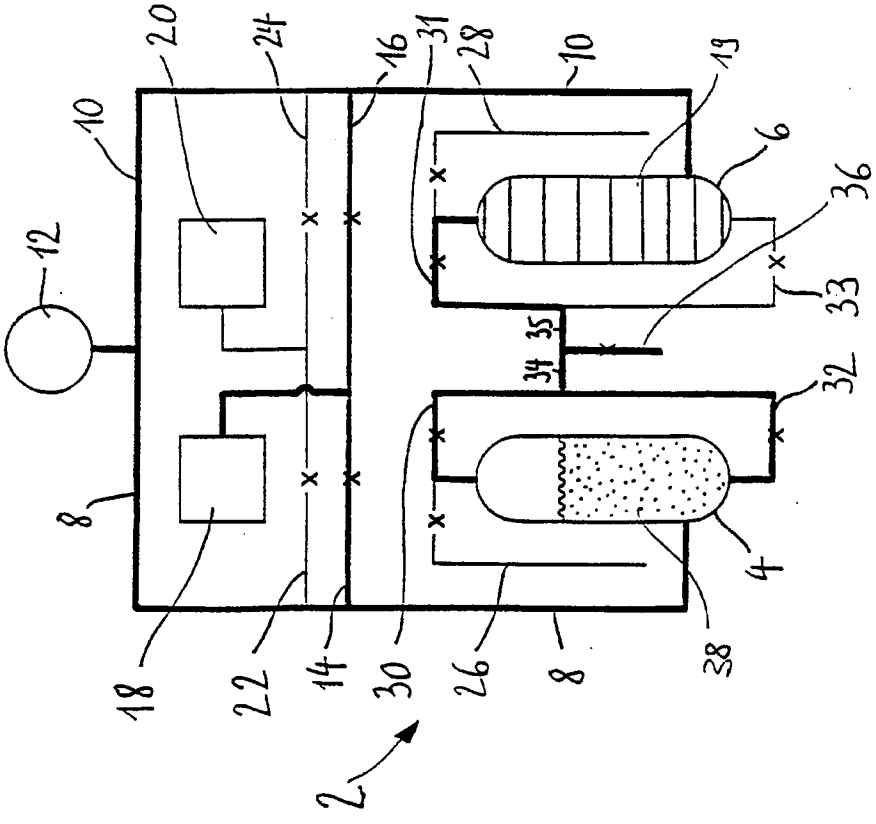

20
24
16
31
28
10
19
6
36
33
35
34
32
12
10
8
4
18
22
14
30
26
8
38
2

Fig. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/09422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12M1/34 C12M1/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
C12M EPO-Internal WPI PAJ BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2 147 271 A (R. SCHWARZ) 14 February 1939 (1939-02-14) page 1, column 2, line 13 -page 3, column 1, line 67; claims; figure ---	1-11
A	WYSS C: "SELECTED LOW-COHESION VARIANTS OF ACTINOBACILLUS-ACTINOMYCETEMCOMITANS AND HAEMOPHILUS-APHROPHILUS LACK DISTINCT ANTIGENS RECOGNIZED BY HUMAN ANTIBODIES" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 1989, vol. 151, no. 2, 1989, pages 133-136, XP002136552 ISSN: 0302-8933 abstract ---	1
A	EP 0 620 273 A (GAZ DE FRANCE) 19 October 1994 (1994-10-19) --- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
27 April 2000	12/05/2000

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Coucke, A

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International . ication No
PCT/EP 99/09422

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication,where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 1 064 614 A (F. SCH,MIDT ET AL.) 17 May 1954 (1954-05-17) abstract; figures	1

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 99/09422

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2147271 A	14-02-1939	NONE	
EP 0620273 A	19-10-1994	FR 2702764 A	23-09-1994
		AT 188732 T	15-01-2000
		DE 69422542 D	17-02-2000
		NO 940909 A	20-09-1994
		OA 9894 A	15-09-1994
FR 1064614 A	17-05-1954	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationa. Aktenzeichen
PCT/EP 99/09422

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12M1/34 C12M1/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
C12M EPO-Internal WPI PAJ BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2 147 271 A (R. SCHWARZ) 14. Februar 1939 (1939-02-14) Seite 1, Spalte 2, Zeile 13 -Seite 3, Spalte 1, Zeile 67; Ansprüche; Abbildung ---	1-11
A	WYSS C: "SELECTED LOW-COHESION VARIANTS OF ACTINOBACILLUS-ACTINOMYCETEMCOMITANS AND HAEMOPHILUS-APHROPHILUS LACK DISTINCT ANTIGENS RECOGNIZED BY HUMAN ANTIBODIES" ARCHIVES OF MICROBIOLOGY 1989, Bd. 151, Nr. 2, 1989, Seiten 133-136, XP002136552 ISSN: 0302-8933 Zusammenfassung ---	1
A	EP 0 620 273 A (GAZ DE FRANCE) 19. Oktober 1994 (1994-10-19) ---	
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
27. April 2000	12/05/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Coucke, A

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/09422

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FR 1 064 614 A (F. SCH,MIDT ET AL.) 17. Mai 1954 (1954-05-17) Zusammenfassung; Abbildungen	1

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/09422

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2147271 A	14-02-1939	KEINE	
EP 0620273 A	19-10-1994	FR 2702764 A	23-09-1994
		AT 188732 T	15-01-2000
		DE 69422542 D	17-02-2000
		NO 940909 A	20-09-1994
		OA 9894 A	15-09-1994
FR 1064614 A	17-05-1954	KEINE	